

Multiplicação *in vitro* de cultivares de amoreira-preta

Roberto Pedroso de Oliveira²
Antonio Fernando Pacheco Nino³
Letícia Vanni Ferreira⁴

Introdução

A amoreira-preta pertence à família Rosaceae, gênero *Rubus*, que compreende mais de 300 espécies nativas da Europa, África, Ásia e América, inclusive do Brasil (Santos et al., 1997). A cultura destaca-se pela grande demanda por mão-de-obra e pela alta rentabilidade por área, tornando-se apropriada para a agricultura familiar (Oliveira et al., 2004).

Desde 1975, a Embrapa Clima Temperado vem conduzindo um programa de melhoramento genético da amoreira-preta, tendo lançado as cultivares Ébano, em

1981, Tupy, em 1988, Guarani, em 1988, e Xavante, em 2004. Nesse período, também foram introduzidas as cultivares Brazos, da Universidade Texas A&M, e a 'Comanche' e a 'Cherokee' da Universidade de Arkansas (Santos et al., 1997).

A propagação da amoreira-preta pode ser realizada por estaquia de raízes, enraizamento de estacas e por cultura de tecidos em laboratórios de micropropagação, sendo este último procedimento o mais seguro para evitar a contaminação por vírus, fungos, bactérias e nematóides (EPPO, 2004).

¹Trabalho de pesquisa realizado com apoio financeiro do CNPq e da Fapergs.

²Eng. Agrôn., Dr., Embrapa Clima Temperado, Cx.P. 403, CEP 96001-970, Pelotas-RS. (rpedroso@cpact.embrapa.br)

³Assistente de pesquisa, Embrapa Clima Temperado. (nino@cpact.embrapa.br)

⁴Graduanda em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Cx.P. 354, CEP 960001-970, Pelotas-RS. (letivf@hotmail.com)

Há 15 anos, a Embrapa Clima Temperado vem aprimorando protocolo para a micropropagação de cultivares de amoreira-preta. Nesse período, dezenas de milhares de mudas foram produzidas por meio desse sistema, sendo disponibilizadas a produtores de diferentes Estados. Em função do gênero *Rubus* ser bastante responsivo *in vitro*, um único protocolo de micropropagação vem sendo utilizado, com pequenas variações introduzidas por cada laboratório, em função de suas condições locais (Oliveira et al., 2004). Porém, ainda não foi quantificado o comportamento das principais cultivares quanto ao seu potencial de micropropagação, o que é muito importante para a etapa de planejamento da produção nos laboratórios.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi quantificar o potencial de multiplicação *in vitro* das cultivares de amoreira-preta Brazos, Cherokee, Comanche, Ébano, Guarani, Tupy e Xavante.

Metodologia

O trabalho foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, situado em Pelotas, RS, avaliando sete cultivares de amoreira-preta: Brazos, Cherokee, Comanche, Ébano, Guarani, Tupy e Xavante.

Considerando-se as melhores características de sanidade e de produtividade, ponteiros de ramos recém brotados, com

aproximadamente 6 cm de comprimento, foram coletados de cada cultivar, no Banco de Germoplasma de Pequenas Frutas da Embrapa Clima Temperado. A desinfestação dos brotos foi realizada em soluções compostas por álcool 70%, durante 10-15 segundos, e hipoclorito de sódio a 1%, durante 10 minutos. Em seguida, foram lavados três vezes com água destilada e autoclavada, sob condições assépticas.

Em janeiro de 2006, 60 meristemas ($\pm 0,3$ mm) de cada cultivar foram isolados em câmara de fluxo laminar, sob lupa estereoscópica com aumento de até 40 vezes, utilizando pinça e bisturi. Em seguida, esses meristemas foram inoculados (Subcultivo 0), individualmente, em tubos de ensaio (15mm x 150mm) contendo 6 mL de meio semi-sólido composto pelos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido com 0,5 mg L⁻¹ de tiamina, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina, 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 2 mg L⁻¹ de glicina, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 6 g L⁻¹ de agar, 1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e 0,1 mg L⁻¹ de AG₃ (ácido giberélico). Após a adição de agar, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,9. A autoclavagem foi realizada à temperatura de 121°C à 1,5 atm, por 15 minutos. Os meristemas introduzidos *in vitro* foram mantidos em câmara escura por 36 horas para evitar oxidação. Posteriormente, foram conduzidos à sala de cultura com intensidade luminosa de

20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após 60 dias, foram escolhidos os explantes mais desenvolvidos de cada cultivar para dar seqüência ao processo de multiplicação. Estes foram transferidos para frascos de vidro (120mm de altura x 50mm de diâmetro) contendo 40 mL do meio de cultura MS suplementado com 0,8 mg L^{-1} de BAP, sendo inoculados com o tamanho de 3-5 mm, contendo de duas a quatro gemas. O ajuste do pH, a autoclavagem e as condições de cultivo foram realizados da mesma forma relatada anteriormente. Desta maneira, foram conduzidos seis subcultivos de 40 dias, avaliando-se as taxas de multiplicação e de contaminação dos explantes, os níveis de oxidação e de vitrificação e o estado geral das plântulas. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente ao acaso, com dez repetições, sendo as unidades experimentais constituídas por um frasco contendo cinco explantes. As taxas de multiplicação das cultivares, nos subcultivos 3 a 6, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, mediante prévia transformação dos dados para $(x+0,5)^{1/2}$. A estimativa do número de plântulas obtidas de cada cultivar foi realizada multiplicando-se as taxas de multiplicação obtidas nos seis subcultivos.

O enraizamento das plântulas foi realizado *in vitro*, utilizando meio de cultura semi-sólido MS com metade da concentração dos sais

e 0,5 mg L^{-1} ANA. Para esta fase, foram utilizadas todas as plântulas maiores que 6 mm, as quais foram individualizadas. Após 30 dias, as plântulas que se desenvolveram foram transplantadas em bandejas de isopor de 72 células, contendo substrato comercial Plantmax HT[®]. As bandejas foram dispostas em túnel plástico no interior de casa-de-vegetação com controle de temperatura (25-30°C) e de irrigação. Gradativamente, ao longo de 15 dias, a cobertura plástica foi sendo removida até completar a aclimatização.

Resultados e Discussão

Na fase de estabelecimento *in vitro* (Subcultivo 0), as cultivares Ébano, Comanche e Guarani apresentaram as maiores porcentagens de meristemas desenvolvidos, respectivamente de 63%, 73% e 70%. As menores foram obtidas com as cultivares Brazos (17%), Cherokee (17%), Tupy (17%) e Xavante (30%). No mês de janeiro de 2006, quando foi realizada a extração dos meristemas, as plantas matrizes apresentavam brotações novas, estando na fase ideal para iniciar a micropropagação. A baixa porcentagem de desenvolvimento dos meristemas, com média de 41%, deveu-se, provavelmente, ao material vegetal ter sido coletado do campo e não de casa-de-vegetação (Oliveira & Silva, 1997).

Independentemente da cultivar, a taxa média de multiplicação foi de 6,2 plântulas por subcultivo

(Tabela 1). Este resultado evidencia o adequado ajuste do meio e das condições de cultura e a facilidade da micropropagação da amoreira-preta.

No presente trabalho, verificou-se efeito pronunciado da cultivar

no desenvolvimento *in vitro* das plântulas (Tabela 1). As taxas médias de multiplicação por subcultivo foram de 7,8 para a 'Ébano', 6,6 para 'Tupy', 6,1 para 'Cherokee', 6,1 para 'Comanche', 5,9 para 'Xavante', 5,5 para 'Brazos' e 5,4 para 'Guarani'.

Tabela 1. Taxa média de multiplicação por subcultivo de cultivares de amoreira-preta (*Rubus* spp.) durante a micropropagação.

Cultivar	Subcultivo						Taxa média multiplicação
	1	2	3	4	5	6	
Brazos	2,3	3,3	7,7 bc	5,8 e	6,1 c	7,9 bc	5,5
Cherokee	1,7	4,4	8,0 bc	7,0 de	6,8 bc	8,5 b	6,1
Comanche	2,1	2,3	9,3 b	7,4 bcd	7,0 bc	8,5 b	6,1
Ébano	2,4	4,4	10,2 a	10,3 a	9,8 a	9,8 a	7,8
Guarani	2,6	2,6	5,9 d	7,1 cde	7,1 bc	7,1 c	5,4
Tupy	1,6	4,4	7,7 bc	8,9 ab	8,2 b	8,6 b	6,6
Xavante	2,7	3,0	6,8 cd	8,4 bc	7,4 bc	7,2 c	5,9
Média	2,2	3,5	7,9	7,8	7,5	8,2	6,2
CV (%)	8,0	11,5	7,1	6,5	9,7	4,8	-

¹Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na análise estatística, os valores foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

Destacadamente, a cultivar Ébano apresentou o maior potencial de multiplicação *in vitro*, estimando-se a obtenção de 106.550 mudas por meristema inicial, após seis subcultivos de 40 dias (Figura 1). Isto também ficou evidenciado pelos resultados do teste de Tukey a 5% de probabilidade, ao se comparar as taxas médias de multiplicação das cultivares nos subcultivos 3 a 6 (Tabela 1). O fato das plântulas da cultivar Ébano terem apresentado as menores taxas médias de oxidação (1%), contaminação (0%) e vitrificação (0%) (Tabela 2) contribuíram para sua alta performance *in vitro*.

Após a cultivar Ébano, a 'Tupy' apresentou o maior potencial de multiplicação *in vitro*, ou seja, 34.022 mudas após seis subcultivos de 40 dias. Esta cultivar, que é, atualmente, a mais plantada no Brasil, já havia sido relatada como altamente responsiva *in vitro* por Mayer et al. (1997). Estes autores obtiveram taxa média de multiplicação de 4,5 para a cv. Tupy contra apenas 2,8 para 'Cherokee'. O maior vigor das cultivares Ébano e Tupy em relação à 'Cherokee' e à 'Comanche' também havia sido observado por Antunes et al. (2000), ao quantificarem a produção de matéria seca da parte aérea de

estacas enraizadas em campo.

Em seguida e em ordem decrescente, o potencial de multiplicação foi de 24.651 mudas para a cultivar Xavante, 24.211 para 'Cherokee', 19.778 para 'Comanche', 16.335 para 'Brazos' e 14.275 'Guarani' (Figura 1). Pelos resultados obtidos, não se pode correlacionar o potencial de multiplicação com a origem das cultivares, uma vez que a 'Brazos' é um dos parentais das cultivares Ébano, Guarani,

Comanche e Cherokee, e a 'Comanche' da 'Ébano' e da 'Tupy' (Raseira et al., 1984).

Durante o cultivo *in vitro*, as plântulas das cultivares estudadas não apresentaram formação de calos. Conseqüentemente, não se verificou a ocorrência de mudas morfológicamente atípicas nas condições *in vitro* e no viveiro.

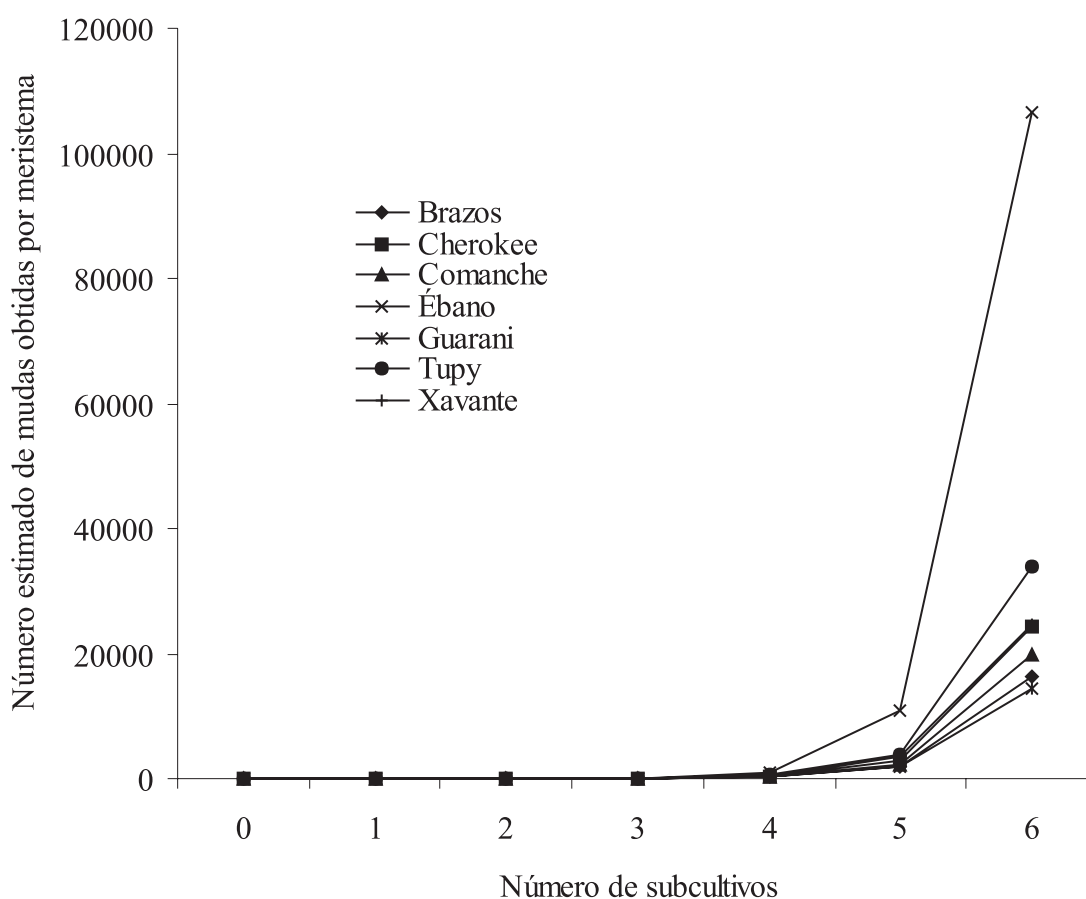


Figura 1. Número estimado de mudas de sete cultivares de amoreira-preta (*Rubus* spp.), micropropagadas ao longo de seis subcultivos.

Durante a fase de multiplicação (subcultivos 1 a 6), não houve contaminação nem oxidação dos explantes das sete cultivares

estudadas (Tabela 2), revelando condições adequadas de cultivo *in vitro* e de manipulação dos explantes.

Tabela 2. Porcentagem de explantes por subcultivo (SC) de cultivares de amoreira-preta (*Rubus* spp.) contaminados por fungos e/ou bactérias (C), com sintomas de vitrificação (V) e de oxidação (O) durante a micropropagação.

Cultivar	SC 0			SC 1			SC 2			SC 3			SC 4			SC 5			SC 6			Média		
	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O
Brazos	10	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	1	1	4
Cherokee	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	10	0	0	30	0	0	7	7
Comanche	10	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	25	0	0	50	0	1	12	3
Ébano	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Guarani	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	10	0	0	30	0	0	7	1
Tupy	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	0	1	4
Xavante	5	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	1	1	4
Média	4	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	16	0	0	17	0	1	4	4

A partir do quarto subcultivo, independentemente da cultivar, os explantes começaram a apresentar sintomas crescentes de vitrificação: 3% no subcultivo 4, 16% no subcultivo 5 e 17% no subcultivo 6. Esses sintomas foram mais intensos nas cultivares Comanche, Cherokee e Guarani, chegando a atingir médias de 50%, 30% e 30% no 6º subcultivo. Apenas na 'Ébano' não houve sintomas de vitrificação.

Neste trabalho, praticamente 100% das plântulas submetidas ao enraizamento *in vitro* apresentaram desenvolvimento satisfatório de raízes. Deve-se destacar que esta espécie também apresenta grande facilidade de enraizamento de estacas em campo (Antunes et al., 2000), refletindo seu comportamento *in vitro* quanto a essa característica.

A eficiência do processo de aclimatização das plântulas foi em torno de 97%, sem haver variação entre as cultivares. As mudas apresentaram crescimento vigoroso em casa-de-vegetação, evidenciando a eficiência do sistema utilizado

para alongamento, enraizamento, pegamento e desenvolvimento das mudas.

Conclusões

As cultivares de amoreira-preta apresentam variabilidade genética pronunciada quanto ao potencial de multiplicação *in vitro*.

A cultivar Ébano apresenta o maior potencial de multiplicação *in vitro*, seguida por 'Tupy', 'Cherokee', 'Comanche', 'Xavante', 'Brazos' e 'Guarani'.

O sistema de micropropagação avaliado proporciona altas taxas de multiplicação para várias cultivares de amoreira-preta, com níveis mínimos de contaminação e de oxidação das plântulas.

Referências bibliográficas

ANTUNES, L.E.C.; CHALFUN, N.N.J.; REGINA, M.A. Propagação de cultivares de amoreira-preta (*Rubus* spp.) através de estacas lenhosas.

Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 195-199, 2000.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Certification schemes: pathogen-tested material of *Rubus*. Paris, 2004. 9 p.

MAYER, M.D.B.; PASQUAL, M.; OLIVEIRA, P.D.; MOREIRA, M.A. Efeito de diferentes reguladores de crescimento e sulfato de adenina na propagação *in vitro* de amora-preta. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 381-385, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, R.P.; SILVA, S.O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 32, n. 4, p. 415-420, 1997.

OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; SILVA, F.O.X. Produção de mudas de amora-preta por meio de cultura de tecidos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 23 p. (Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 6).

RASEIRA, M.C.B.; SANTOS, A.M.; MADAIL, J.C.M. Amora-preta: cultivo e utilização. Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1984. 20 p. (Embrapa-CNPFT. Circular Técnica, 11).

SANTOS, A.M.; RASEIRA, M.C.B.; MADAIL, J.C.M. Amora-preta. 2. ed. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT, 1997. 61 p. (Coleção Plantar, 33).

Comunicado Técnico, 154

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: Embrapa Clima Temperado
Endereço: Caixa Postal 403
Fone/fax: (53) 3275-8199
E-mail: sac@cpact.embrapa.br



1ª edição
1ª impressão 2006: 50 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro
Secretário-Executivo: Joseane M. Lopes Garcia
Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Verneti Azambuja, Luís Antônio Suita de Castro.
Suplentes: Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes

Expediente

Revisão de texto: Sadi Sapper
Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos
Editoração eletrônica: Oscar Castro, Miguel Ângelo